

**L-Asparagin-Synthetase  
nach Induktion mit L-Asparaginase  
am Ehrlich Ascites Carcinom**

Wolfgang Lang

—

1975  
—







Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

( Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk )

Lehrstuhl Innere Medizin, speziell Hämatologie

( Komm. Direktor Professor Dr. R. Marx )

---

L - Asparagin - Synthetase nach Induktion mit L - Asparaginase  
am Ehrlich Ascites Carcinom

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig - Maximilian - Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Lang

aus München

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ehrhart  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Marx  
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.6.1975

Tag der mündlichen Prüfung:



## I. Einleitung und Fragestellung

## II. Methodik

Bestimmungsprinzip der Asparagin - Synthetase

Das Ehrlich Ascites Carcinom

Punktion der Ascitesflüssigkeit

Vorbereitung zur Säulenchromatographie

Chromatographische Trennung von Asparaginsäure und Asparagin

Auswertung und Berechnung

Bezug der Meßergebnisse auf den Proteingehalt

## III. Ergebnisse

1. Die Aktivität der L - Asparagin - Synthetase in Tumorzellen bei unbehandelten Mäusen

2. Die zelluläre Aktivität der L - Asparagin - Synthetase nach Gabe von 200 E. L - Asparaginase

3. Die zelluläre Aktivität der L - Asparagin - Synthetase nach Gabe von 200 E. L - Asparaginase bezogen auf den Proteingehalt

## IV. Diskussion der Ergebnisse

## V. Zusammenfassung

## VI. Tabellen

## VII. Abbildungen

## VIII. Schrifttum



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551907\\_0083](https://archive.org/details/IA41551907_0083)

## I. Einleitung und Fragestellung

Während der letzten Jahrzehnte sind große Anstrengungen unternommen worden, Substanzen zu finden, die das Wachstum maligner Neoplasien verhindern oder deren Zellen zerstören können. Ausdruck dieser Bemühungen ist die Entwicklung einer Reihe von Medikamenten, die das Leben tumorkranker Patienten verlängern oder erträglicher machen können. Die zur Therapie verwendeten Chemotherapeutika vom Typ der alkylierenden Verbindungen, der Antimetabolite u.a. wirken jedoch nicht spezifisch auf die Neoplasiezellen, so daß auch andere normale Gewebe mit schneller Zellteilung ungünstig beeinflusst werden. Es muß bereits bei der Applikation therapeutischer Dosen gleichzeitig mit der Hemmung des neoplastischen Gewebes auch mit Funktionsstörungen des Knochenmarkes, der Keimdrüsen, des Haarwachstums etc. gerechnet werden.

Ein chemotherapeutisch nutzbarer Defekt im Zellstoffwechsel der Neoplasiazelle war bisher nicht bekannt. Erst neuere Untersuchungen deckten eine Stoffwechseleigenart mancher Krebszellen auf: Die für das Leben und Wachstum maligner Zellen essentielle Aminosäure L - Asparagin bei gleichzeitigem zellulären Asparagin - Synthetase - Mangel.

1953 berichtete KIDD (27) erstmals über immunologische Experimente, in denen er mit Kaninchen-Antiseren die Wirkung auf transplantierte Leukämien der C3H Maus untersuchte. Er behandelte die Mäuse außerdem noch mit Meerschweinchenserum, in der Hoffnung, durch dessen Gehalt an Komplement die antileukämische Wirkung des Immunserums noch zu steigern. Da auch Mäuse, die bei Kontrollversuchen nur mit Meerschweinchenserum behandelt worden waren eine deutliche Hemmung

der transplantierten Lymphome zeigten, wandte sich der Autor der näheren Untersuchung des Meerschweinchenserums zu. Der Hemmeffekt war dahingehend spezifisch, als nur Meerschweinchenserum und nicht das Serum anderer Säugetiere einen Rückgang der malignen Zellen bewirkte, zum anderen das Meerschweinchenserum nur gegen eine begrenzte Anzahl von experimentell erzeugten Lymphomen wirksam war; so gegen das GARDNER Lymphosarkom 6C3HED der C3H Maus, das LORENZ Lymphoma II der Maus und das MURPHY - STURM Lymphosarkom der Wistar Ratte. KIDD zeigte weiterhin, daß das wirksame Agens im Meerschweinchenserum mit der Globulinfraction wandert und relativ hitzebeständig ist; er vermutete ein Protein als verantwortlich für die Antitumorwirkung.

BROOME konnte 1961 nachweisen, daß es sich bei dem antitumorwirksamen Agens um L - Asparaginase handelt (8). Die L - Asparaginase und der "Antilymphomfaktor" stimmten in einer Reihe von Eigenschaften überein: Inaktivierung bei 66°C, pH Optimum bei ca 7, ferner war auch Serum neugeborener Meerschweinchen sowohl arm an L - Asparaginase, als auch gering in seiner Antilymphomwirkung; L - Asparaginase und "Antilymphomfaktor" fanden sich nach Reinigung durch Elektrophorese und Säulenchromatographie stets in der gleichen Fraktion. 1963 berichtete BROOME (9), daß Lymphomzellen in der Zellkultur im Gegensatz zu resistenten Zellen L - Asparagin im Medium benötigen. Zellen, die durch mehrere Passagen in vitro vom L - Asparagin unabhängig geworden waren, erwiesen sich auch in vivo als resistent gegen Meerschweinchenserum.

Darauf aufbauend fand BROOME 1968 (11), daß es bei Versuchen mit auf Mäuse übertragenen Lymphomen bei Gabe von L - Asparaginase aus Agouti Serum und Escherichia coli zu einer signifikanten Senkung von freiem Asparagin im Blut und in den Zellen kommt. Normale Zellen

und resistente 6C3HED Lymphome überlebten unbeschadet bei einem intrazellulären Asparaginspiegel, der für sensible Lymphome bereits kritisch ist. Als Erklärung wird angenommen, daß resistente Zellen nicht nur eine höhere Asparagin-Synthese-Kapazität besitzen als sensible Zellen, sondern anscheinend auch befähigt sind, endogenes Asparagin zur Proteinsynthese zu nützen. In zellfreien Extrakten von resistenten Zellen konnte im Gegensatz zu sensiblen Zellen Asparaginsynthetase nachgewiesen werden (11); dagegen sind Asparaginase empfindliche Tumoren nur in geringem Umfang in der Lage, Asparagin zu bilden und es deshalb aus dem Extrazellulär-raum beziehen müssen. Auf der anderen Seite erzeugen resistente Tumoren Asparagin in genügender Quantität (42). Asparaginsynthetase-messungen in resistenten Zellen und sensiblen Zellen haben diese Hypothese unterstützt. Der Synthetasespiegel in sensiblen 6C3HED und P 1798 Zellen wurde als extrem niedrig und bei 6C3HED - S häufig als null angegeben (42). Alle Asparaginase-resistenten Lymphome hatten eine beträchtlich höhere Aktivität der Asparaginsynthetase. Nach Asparaginaseverabreichung stieg die zelluläre Asparaginsynthetase in resistenten Tumoren erheblich an und blieb auch während einer 24 stündigen Beobachtungszeit erhöht; dagegen reagierten Asparaginase-empfindliche Tumoren nur schwach mit einer Steigerung der Synthetaseaktivität, in dem sie bei 4 Stunden ein Maximum erreichte (42). Von sieben verschiedenen Asparaginase-sensiblen Leukämien der Maus wies jedoch nur eine die erwartete sehr geringe Asparagin-Synthetase-Aktivität auf (26). Als Erklärung wird angenommen, daß der geringe Spiegel der Synthetase-Aktivität von einer Einbeziehung normaler Wirtszellen in die Präparation herrührt. Im Gegensatz dazu enthalten Asparaginase-resistente Linien, die sich von den Asparaginase-empfindlichen Leukämien herleiten,

eine relativ hohe Asparagin-Synthetase-Aktivität (26), zwei zeigten eine wesentlich höhere Aktivität als Normalgewebe. Diese Beobachtungen bestärkten die Vorstellung, daß die Aktivität der Asparagin-Synthetase mit der Resistenz oder der Sensibilität eines Tumors gegenüber Asparaginasebehandlung in Beziehung gebracht werden kann. Die Sensibilität eines Tumors gegenüber Asparaginase infolge mangelnder oder fehlender Asparagin-Synthetase-Aktivität läßt an einen definierten zellulären genetischen Defekt denken. Die sensible Leukämiezelle kann als eine auxotrophe Mutante angesehen werden (26). Resistenzentwicklung gegenüber Asparaginase durch sensible Tumoren erfordert die Induktion der Asparagin-Synthetase-Aktivität, die für normale Zellen und resistente Tumoren charakteristisch ist. Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen mit L - Asparaginase aus Meerschweinchenserum und Escherichia coli wurden in vitro und in vivo durchgeführt. In allen Experimenten konnte eine gute Übereinstimmung zwischen Tumor-Regression und dem L - Asparagin - Bedarf der Tumorzellen nachgewiesen werden (1,6,7,9,12,13,27,28). Als besonders sensibel erwiesen sich Mause-Tumoren: Schon kurz nach der Applikation der L - Asparaginase starben die Tumorzellen ab. Als Nebenwirkungen wurden Anämien, Leukopenien, Fettleber, vorübergehende Gewichtsabnahme, Veränderungen des Lipidspiegels und allergische Reaktionen beobachtet (32).

Über den Wirkungsmechanismus der L - Asparaginase soll hier etwas näher eingegangen werden. Als Substrat der L - Asparaginase ist Asparagin eine nicht essentielle Aminosäure. Das Enzym Aspartase katalysiert reversibel die Reaktion von Ammoniak und Fumarsäure zu L - Asparaginsäure; sie leitet sich also vom Zitronensäurezyklus ab und besitzt eine relativ bedeutende Rolle im Zellstoffwechsel.

Die L - Asparaginsäure hat über die Carbamylasparaginsäure Verbindung zum Pyrimidinstoffwechsel und zu den Nukleinsäuren; durch Decarboxylierung entsteht die Aminosäure L - Alanin, durch Transaminierung Oxallessigsäure; auch Threonin kann auf eine komplizierte Weise gebildet werden. Im Gegensatz zur L - Asparaginsäure hat L - Asparagin keine solche zentrale Stellung; bis heute ist nur eine Funktion des L - Asparagin bekannt, sein Einbau in Proteine. Durch enzymatische Spaltung der Carboamidgruppe entsteht aus L - Asparagin die L - Asparaginsäure und  $\text{NH}_4$ . Katalysator dieser Reaktion ist die L - Asparaginase. Katalysator der enzymatischen Synthese ist die L - Asparaginsynthetase; diese Reaktion ist energieverbrauchend, erfolgt also nur in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen und beruht auf einer Umgruppierung der Amidogruppe des L - Glutamins auf die L - Asparaginsäure (3,22).

Für die Therapie mit L - Asparaginase ist entscheidend, daß bestimmte Tumoren und Hämoblastosen eine nur mangelhafte oder sogar völlig fehlende zelluläre Asparagin-Synthetase-Aktivität aufweisen und somit von der Zufuhr extrazellulären Asparagins abhängig sind. Durch Injektionen von L - Asparaginase kann die Konzentration an Asparagin soweit verringert werden, daß die Proteinsynthese von Tumorzellen irreversibel gestört wird und sie nach kurzer Zeit zugrunde gehen (18). Die unmittelbare Folge einer L - Asparaginase Injektion ist also ein Asparaginabbau und damit eine Verarmung des Blutes an Asparagin, wobei gleichzeitig auch der Asparagingehalt der Organe abnimmt. Die einfachste Erklärung für diese selektive Wirkung ist die Annahme einer Deletion im Genom dieser Zellen, so daß sie im Gegensatz zu Normalzellen oder L - Asparaginase resistenten Zellen auf exogenes Asparagin angewiesen sind und bei dessen Fehlen am Mangel einer essentiellen Amino-

säure zugrunde gehen. Vergleiche zwischen L - Asparaginase sensiblen und resistenten Lymphomen führten zu dem Ergebnis, daß sich nach Applikation von L - Asparaginase der Asparagingehalt stark senkt; so wird auch der Einbau von <sup>14</sup> C - markiertem L - Asparagin durch L - Asparaginase in beiden Fällen stark gehemmt. Während sensible Zellen eine signifikant größere Menge an exogenem L - Asparagin einbauen, besitzen resistente Zellen eine wesentlich höhere Asparagin-Synthetase-Aktivität, die sie weitgehend unabhängig macht (26). Entscheidend für die weiteren Forschungen war das Auffinden er-giebiger Asparaginasequellen; man fand Asparaginase im Serum von Meerschweinchen (8,9), Capybara, Paca und Agouti (39), wirkungslose Asparaginase in Hefe (32) und im Bacillus coagulans (33). Erst die Entdeckung der L - Asparaginase aus Escherichia coli (33) lieferte ein nutzbares Reservoir zur methodischen Gewinnung von Asparaginase (13). Sie zeigte die stärkste Antitumorwirksamkeit (11) bedingt durch langsame Abbaugeschwindigkeit, bzw. lange Halbwertszeit. Zur technischen Herstellung wird Escherichia coli B, K oder O verwendet, wobei etwa 800 Liter E. coli Kultur 0,3 g Enzym ergeben. Da das Enzym in den Bakterienzellen lokalisiert ist, muß die Wirksubstanz vor der Reinigung durch Aufschluß der Bakterienzellen freigesetzt werden. Die Aufarbeitung und Entfernung der Pyrogene erfolgt durch die in der Proteinchemie üblichen Fällungs- und Chromatographie-methoden und führt zu immunologisch einheitlichen Produkten (34).

Nach erster unstrittener klinischen Anwendung von L - Asparaginase aus Agouti Serum (3) und aus Meerschweinchenserum bei einem Fall akuter Lymphoblastenleukämie ohne klaren therapeutischen Erfolg, ebnete die Entdeckung der L - Asparaginase aus Escherichia coli und die Entwicklung von Methoden zu ihrer Gewinnung den Weg für

eine weite klinische Anwendung. Behandelt wurden Patienten mit akuter Lymphoblastenleukämie mit einer unterschiedlichen Tagesdosis von 50 bis 200 I.E. pro kg Körpergewicht i.v. für 6 bis 112 Tage (36). Es zeigten sich Knochenmarksremissionen von 9,10 und 15 Wochen. Bei den Patienten, die auf das Mittel ansprachen, normalisierte sich das weiße Blutbild im Gefolge einer Milzverkleinerung (35). Einen minimalen Effekt hatte die L - Asparaginase auf gesunde Lymphozyten (13,5%), während leukämische Lymphozyten zu 66,5% abgetötet wurden (43). Da sich nicht alle Tumorzellen gegenüber Asparaginentzug empfindlich zeigten, wurde in Anlehnung an SOBIN und KIDD (34) ein klinischer Vortest auf Asparagin-Ansprechbarkeit menschlicher Malignome aufgebaut. Die 3-H-Valin Aufnahme durch isolierte Malignomzellen in der in vitro Kultur dient dabei als Kriterium der Empfindlichkeit auf Asparaginasetherapie (34). Es zeigte sich, daß die L - Asparaginasetherapie am besten bei Patienten mit akuten Lymphoblastenleukämien ansprach; Patienten mit malignen Lymphomen, Sarkomen und Carcinomen blieben unbeeinflusst (37).

Die zunächst optimistische Einstellung zu dieser neuartigen Therapie wurde durch zwei ungünstige klinische Erfahrungen eingeschränkt. Die unerwartet zahlreichen, bei manchen Patienten therapiebeschränkenden Nebenwirkungen und die schnelle Resistenzentwicklung. Bei allen behandelten Patienten konnte ein Absinken der Serumproteine und -lipide beobachtet werden (20). Die Immunglobuline zeigten dagegen ein gegenläufiges Verhalten, d.h. eine Zunahme von Ig G, Ig A und Ig M unter Asparaginasetherapie (31). Ferner zeigten sich Störungen im Blutgerinnungssystem; in der Mehrzahl in Form einer Verbrauchskoagulopathie (44). Die häufigsten klinischen Nebenwirkungen sind Erbrechen, Fieber und allergische

Reaktionen (35) und Leberfunktionsstörungen (18,35). Das deutet darauf hin, daß Zellen mit primär niedrigem Asparagin-Synthetase-Gehalt durch exogen erzeugten Asparaginmangel besonders betroffen werden. Unter der Therapie wird ein Anstieg der Synthetase-Aktivität bei primär gegenüber Asparaginentzug empfindlichen Zellpopulationen beobachtet, entweder als Folge einer Zellselektion oder durch Induktion an die Asparagin-Mangelsituation (14).

In der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen über die Aktivität der L - Asparagin - Synthetase in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms bei Goppel Mäusen nach Behandlung mit L - Asparaginase durchgeführt worden, mit der Fragestellung, in welcher Zeit und in welchem Ausmaß sich die Aktivität der L - Asparagin - Synthetase unter einer L - Asparaginasetherapie verändert, d.h. ob der therapeutische Erfolg von der primären Aktivität der Synthetase und ihrer Fähigkeit, sich an einen Asparaginmangel zu adaptieren, abhängig ist.

## II. Methodik

Das Prinzip der Bestimmung der Asparagin-Synthetase besteht in der Inkubation vitaler Zellen mit radioaktiv markierter Asparaginsäure, d.h. mit  $^{14}\text{C}$  uniform markierter Asparaginsäure. Während der Inkubation erfolgt die Umwandlung von Asparaginsäure der Aktivität der zellulären Asparagin-Synthetase entsprechend in Asparagin. Beide markierte Aminosäuren werden Säulenchromatographisch mit Kationenaustauschern getrennt, die Aktivitäten mit dem Scintillationsspektrometer gemessen (5,18).

Die für die Untersuchungen benötigten Mäuse stammten von der Fa. Hoechst/Ffm; als Tierstamm diente die Groppe Maus. Die Tiere - männlich und weiblich - hatten ein durchschnittliches Gewicht von 20 - 30 g. Der auf die Mäuse transplantierte Tumor war das Ehrlich-Carcinom in Ascitesform (PAUL EHRLICH EAT diploid). Für die Stammhaltung wurde dem getöteten Tier Ascites steril entnommen und falls erforderlich mit einer physiologischen NehrLösung verdünnt. Die Zellzahl im Ascites betrug im Durchschnitt bei 7 - 10 Tagen alten beimpften Tieren zwischen 50 und 100 Mio Zellen / ml Ascites. Die Transplantationsmenge betrug 0,2 - 0,5 cm<sup>3</sup> Originalascites i.p., bzw. 15 Mio Zellen in 0,2 cm<sup>3</sup> i.p. Die Zeit bis zur Transplantationsreife betrug etwa 9 Tage, die dann bestehende Ascitesmenge 4 - 8 ml pro Tier. Die Angehrate beim Stamm und beim Versuch betrug jeweils 99%. Der Ascites wies ein milchig trübes Aussehen auf und neigte zu ausgeprägten Niederschlägen auf dem Peritoneum; mit Abnahme der Ascitesmenge traten multiple Bauchraummetastasen auf. Am achten Tag nach der Tumortransplantation wurde mit der Asparaginase-Behandlung begonnen. Verabreicht wurden pro Maus 200 E.

Asparaginase (L - Asparagin amidohydrolase aus *Escherichia coli*, Crasnitin Bayer Leverkusen). Diese einmalige intraperitoneale Injektion wurde mittels Rekord Einmalspritzen und Kanülen vorgenommen. Pro Untersuchungszyklus wurden 3 - 5 Tiere mit Asparaginase behandelt, 1 - 2 Tiere dienten für vergleichende Leerwerte und blieben unbehandelt. Im Abstand von 24 Stunden wurden jedem Tier nach erfolgter Asparaginase Injektion Proben von ca. 1 ml Ascitesflüssigkeit entnommen: Zum Zeitpunkt null, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden später. Bei der intraperitonealen Ascitespunktion zeigte sich, daß die Kanüle durch den Oberschenkel der Maus in die Bauchhöhle vorgeschoben werden mußte, um einen Spontanabfluß der mengenmäßig meist geringen Ascitesflüssigkeit zu verhindern, wie er durch ein direktes Punktieren in die Bauchhöhle infolge des Punktionsloches der erforderlichen dickeren Kanüle bestanden hätte. So wirkte der Muskeltonus und ein flüssiger Sprühverband (Nobecutan Spray) dem Spontanabfluß entgegen. Zur Gewinnung der zellulären Bestandteile des Punktates wurde 1 ml Ascitesflüssigkeit in vorbereitete, mit Eiswasser gekühlte Zentrifugengläser übertragen und mit ca. 2 ml Earle's Balanced Salt Solution (Medium 199 W, GIBCO) bei einer empirisch gefundenen Geschwindigkeit von 900 U/min in einer Zentrifuge (JSE Mistral 62) bei einer Temperatur von 2°-4° C zweimal gewaschen, wobei jeweils vor dem nächsten Waschvorgang der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, wieder 2 ml physiologische Lösung hinzugegeben und mit einem Plastikquirl gut durchmischt wurde. Danach wurde das Punktat in die für die Ultrazentrifuge bestimmten, zuvor leer gewogenen Röhrchen umgefüllt. Nach einem dritten Waschvorgang wurde der Überstand abgesaugt und die Röhrchen mit dem Sediment gewogen, das zuvor ermittelte Leergewicht vom Gesamtgewicht abgezogen und so das Zellgewicht ermittelt. Alle

Vorgänge benötigen eine Kühlung im Eiswasserbad. Für das Zellgewicht bestimmt, wurde mit gleichen Anteilen NaCl aufgefüllt und mit einem Quirl gut durchmischt. Die Zellzahl/mm<sup>3</sup> wurde daraus ermittelt. Das in den Ultrazentrifugen-Röhrchen unter Eiskühlung verbliebene Zellgemisch wurde bei 24000 U/min für die Dauer von 20 sec. homogenisiert (Ultra Turrax) und in der Ultrazentrifuge (MSE Superspeed 65) 80 min zentrifugiert. Inzwischen wurden Reagensgläschen leer gewogen und in Eiswasser kaltgestellt. Der nach dem Ultrazentrifugieren gewonnene Überstand wurde in diese Gläschen gefüllt und diese ein zweites Mal gewogen, was die ml des Überstandes ergab. Zur weiteren Bestimmung der Asparagin-Synthetase wurde folgendes Reaktionsgemisch benötigt:

0,2 ml des zu untersuchenden Überstandes,

0,1 ml ATP (Boehringer Mannheim),

0,1 ml L - Glutamin,

0,2 ml <sup>14</sup>C Asparaginsäure und

0,5 ml Tris Puffer (Mol Tris-HCl-Puffer pH 7,8).

Dieses Reaktionsgemisch wurde für 30 min in einem CO<sub>2</sub> Begasungsbrutschrank (Haereus) inkubiert; danach mit Trichloressigsäure (10%) enteiweißt, 3 - 4 min bei 1100 U/min zentrifugiert und der Überstand in neue gekühlte Reagensgläschen umgefüllt.

Für die Säulenchromatographie wurden folgende drei Lösungen benötigt: Ein Puffer pH 2,8: 15,05 g Lithiumcitrat (tri-Lithiumcitrat krist. Nr. 5683 Merck), 5,95 g Lithiumchlorid (LiCl Nr. 5675 Merck), 10,0 ml 25% ige HCl ad 1000 ml Aqua bidest. und Feineinstellung des pH-Wertes mit verdünnter HCl und pH Meter (Präzisions-pH-Meter, Typ pH 34, Knick Berlin); ein Puffer pH 2,2: 14,1 g Lithiumcitrat, 10,0 ml 25% ige HCl ad 500 ml Aqua bidest., Einstellung des pH Wertes; sowie eine Lithiumhydroxid Lösung zur Reinigung der

Chromatographiesäule: 7,0 g Lithiumhydroxid (etwa 54% LiOH krist. Nr.5693 Merck) ad 500 ml Aqua bidest.

Nach PRAGER und BACHYNSKY, variiert von HORMANN und HAKE (unveröffentlicht) wurden die Proben zur Vorbereitung für die Chromatographiesäule mit Lithiumhydroxid auf einen pH Wert von 2,2 mittels pH Meter eingestellt und mit 1 ml Lithiumcitratpuffer pH 2,2 im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Chromatographiesäule hatte die Maße 9 x 400 mm mit Mantel und Anschlüssen für ein konstantes Temperieren der Säule mit Wasser von 37°C. Das Wasserbad wurde temperiert mit einem Thermomix-variabel. Die Innessäule enthielt ein sahrisches Austauscherharz der Teilchengröße 10 - 15  $\mu$ my, fraktioniert für die Methode nach BENSON und PATTERSON (5). Die mit Lithiumcitrat pH 2,2 verdünnte Probe wurde mit einer Automatikpipette (Eppendorf) in der Menge 1 ml vorsichtig auf die Harzoberfläche ohne Aufwirbeln aufgegeben, mit nachgereinigtem Stickstoff (1 atü) in die Harzoberfläche eingedrückt, dann mit 1,5 ml Lithiumcitratpuffer pH 2,2 nachgewaschen. Die Puffervorratssäule wurde mit Lithiumcitrat pH 2,8 aufgefüllt und an die Chromatographiesäule angeschlossen. Der Druck wurde auf ca. 2,7 - 3,0 atü so eingestellt, daß 1 ml/min als Säuleneluat erschien. Nach einem Vorlauf von 20 ml wurden 24 mal 2 ml Säuleneluat in Reagensgläsern aufgefangen. Die 20 ml Vorlauf waren nötig, um das Säuleneluat einzugrenzen, da nach den Erfahrungswerten die Asparaginsäure bei ca. 40 ml Eluat und das Asparagin bei ca. 60 ml Eluat erschienen. Von den aufgefangenen 24 x 2 ml wurden jeweils 0,5 ml zusammen mit 7,0 ml Bray'scher Lösung in die Szintillationsmessgläser pipettiert. Die zur Szintillationsmessung benötigte Lösung wurde hergestellt mit: 60 g Naphtalin (rein, weiß, sublimiert, Riedel de Haën AG), 4 g Omnifluor (98% PPO+2% Bis-MSB, NEN Chemicals), 100 ml Methanol (p.A. Nr. 6009, Merck), 20 ml Äthylen-

Glykol (Nr. 949, Merck) ad 1000 ml Dioxan (reinst Nr. 3115, Merck). Die 24 Auszählgläserchen wurden in einen Szintillationsspektrometer gegeben (Nuclear Enterprises Limited). Für jedes der 24 Auszählgläserchen lieferte der Probenwechsler eine gedruckte Zahlenreihe. Die Werte der Spalten 2, 3 und 7 waren mit einer Programmkarte zu einem Rechenprogramm zusammengefaßt (Olivetti programma 101). Für jeden der 24 Werte lieferte der Rechenautomat ein Ergebnis in Form von Zahlenwerten, die der im Stufeneluat zuerst erscheinenden Asparaginsäure und dem im zweiten Peak erscheinenden Asparagin quantitativ entsprachen. Als Beispiel:

| 1    | 2      | 3      | 4    | 5      |                |
|------|--------|--------|------|--------|----------------|
| C01Y | 600.00 | 986    | 6339 | 112    |                |
| C02Y | 600.00 | 1099   | 6289 | 125    |                |
| C03Y | 600.00 | 922    | 6470 | 105    |                |
| C04Y | 600.00 | 985    | 6320 | 112    |                |
| C05Y | 600.00 | 142831 | 6167 | 16292  | - 123 = 16179  |
| C06Y | 130.47 | 200000 | 6378 | 104519 | - 123 = 104397 |
| C07Y | 600.00 | 8820   | 6279 | 1004   | - 123 = 881    |
| C08Y | 600.00 | 1234   | 6383 | 140    |                |
| C09Y | 600.00 | 1138   | 6410 | 129    |                |
| C10Y | 600.00 | 1152   | 6363 | 131    |                |
| C11Y | 600.00 | 1187   | 6344 | 135    |                |
| C12Y | 600.00 | 1103   | 6167 | 126    |                |
| C13Y | 600.00 | 1148   | 6364 | 130    |                |
| C14Y | 600.00 | 1164   | 6205 | 132    |                |
| C15Y | 600.00 | 6297   | 6372 | 716    | - 123 = 593    |
| C16Y | 600.00 | 12062  | 6306 | 1372   | - 123 = 1249   |
| C17Y | 600.00 | 3091   | 6270 | 352    | - 123 = 229    |
| C18Y | 600.00 | 956    | 6386 | 108    |                |
| C19Y | 600.00 | 947    | 6315 | 108    |                |
| C20Y | 600.00 | 1037   | 6449 | 117    |                |
| C21Y | 600.00 | 1148   | 6238 | 131    |                |
| C22Y | 600.00 | 1121   | 6268 | 128    |                |
| C23Y | 600.00 | 1024   | 6473 | 116    |                |
| C24Y | 373.38 | 200000 | 7631 | 35646  |                |

Die Asparaginsäure erschien in unserem Beispiel bei Nr. 5 bis 7 (Spalte 3) und das Asparagin bei Nr. 15 bis 17. wurde weiterhin der aus den Normwerten (Spalte 5) gebildete Mittelwert - in dem Beispiel 123 - von den Zahlen der Asparaginsäure und des Asparagin (Spalte 5) abgezogen, ergaben sich die Werte für Asparaginsäure

und Asparagin. Diese wurden addiert und zu 100% gesetzt; durch Dreisatz wurde der prozentuale Anteil des Asparagin errechnet:

|                |               |           |       |
|----------------|---------------|-----------|-------|
| Asparaginsäure | 16179         | Asparagin | 593   |
|                | 104397        |           | 1249  |
| +              | 881           | +         | 229   |
|                | <hr/>         |           | <hr/> |
|                | 121457        |           | 2071  |
| +              | 2071          |           |       |
|                | <hr/>         |           |       |
|                | 123528 = 100% |           |       |
|                | 2071 = 1,67%  |           |       |

Der Höchstwert der Umwandlung von Asparaginsäure der Aktivität der zellulären Asparagin-Synthetase entsprechend in Asparagin betrug 6,43 nmol. Der prozentuale Anteil des Asparagin wurde in einem weiteren Dreisatz den 6,43 nmol = 100% gegenübergestellt. Das Ergebnis lieferte die gesuchten nmol für das Asparagin: 6,43 nmol = 100% ; 1,67% = x nmol ; x = 0,108 nmol. Nachdem die ermittelten nmol für das Asparagin den 30 min im Begasungsbrutschrank entsprachen, war diese Zahl für 60 min nur zu verdoppeln. Die zu Beginn der Untersuchung ermittelte Zellzahl und die gemessene Menge des Überstandes nach dem Ultrazentrifugieren ergab in einem weiteren Dreisatz die Zellzahl für 0,2 ml. Ein vierter Dreisatz, der die Zellzahl auf 100 Mio Zellen bezog, führte schließlich zu dem Ergebnis:

2 ml Säuleneluat in nmol / 60 min / 100 Mio Zellen.

Um weitere Vergleiche zu ermöglichen wurden die Ergebnisse auf den Proteingehalt der Probe bezogen. Zu den Messungen herangezogen wurde der nach der oben beschriebenen Methode gewonnene Überstand nach dem Ultrazentrifugieren. Gemessen wurde der Proteingehalt nach der von OKUYAMA und SATAKE (23) entwickelten Methode, mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure als Reagens freie Aminogruppen in Aminosäuren und Peptiden zu ermitteln. Dabei reagiert die Trinitro-

benzolsulfonsäure spezifisch mit den freien Aminogruppen und bildet Trinitrophenylätherivate (10). Zur Durchführung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt: Die Probe wurde 1:10 verdünnt, d.h. 0,1 ml des Überstandes wurden mit 0,9 ml Aqua dest. verdünnt; 0,1 ml dieser Verdünnung kamen mit 0,9 ml Aqua dest. in Reagensglas Nr. 1; in Reagensglas Nr. 2 wurden als Standard 0,1 ml Lab. trol (B 5100, Merz und Dade) gegeben, dazu wieder 0,9 ml Aqua dest.; in Reagensglas Nr. 3 wurden für den Leerwert 1 ml Aqua dest. gegeben. 1 ml Natriumhydrogencarbonat als Puffer und 1 ml TNBS-Lösung als Reagens (2,4,6,-Trinitrobenzolsulfonsäure p.A. Nr. 37075, SERVA) wurde in alle drei Reagensgläser gegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank (Haereus) inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion im Eiswasserbad, mit 1 ml Dodecylhydrogensulfat zur Lösung der Proteine und 0,5 ml 1 n HCl zur Vermeidung von Niederschlägen von gelöstem Protein. Abgelesen wurde an einem Photometer (Zeiss Opton) bei einer Wellenlänge von 335 mμ, die empirisch als Maximum gefunden wurde, gegen einen Leerwert, der wie oben beschrieben als Nr. 3 die Versuchsanordnung durchlief. Der Rechnungsgang: Der Standard lag konstant bei 49,0 als Extinktionswert. Ein angenommener Extinktionswert der Probe lag bei 26,2; dieser Wert wurde mittels Tabelle logarithmiert = 0,5817. Der logarithmierte Standardwert betrug 0,3090, was 141 mikrog entsprachen. Durch einen Dreisatz war zu ermitteln:

$$0,3090 = 141 \text{ mikrog}; 0,5817 = x \text{ mikrog}; x = 265 \text{ mikrog}$$

Da diese Werte 0,1 ml entsprachen, waren für 0,2 ml 5,30 mg einzusetzen; die nmol der entsprechenden Probe betrugen 0,232:

$$0,232 \text{ nmol} / 60 \text{ min} / 5,30 \text{ mg} \text{ oder } 0,0438 \text{ nmol} / 60 \text{ min} / 1,0 \text{ mg.}$$

### III. Ergebnisse

1. Die Bestimmung der L-Asparaginsynthetase-Aktivität in Ascites-tumorzellen unbehandelter Groppel Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit seit der Tumortransplantation als Vergleichs- und Leerwerte zu den mit L-Asparaginase behandelten Mäusen.

a) Am 8. Tag nach der Tumortransplantation lagen die Werte bei 12 Bestimmungen zwischen 0,087 nmol/60 min/100 Mio Zellen und 0,517 nmol/60 min/100 Mio Zellen. Der aus diesen Messungen gewonnene Mittelwert lag bei 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen.

b) Am 9. Tag nach der Tumortransplantation lagen die Werte bei 2 Bestimmungen bei 0,199 nmol/60 min/100 Mio Zellen und 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen. Der resultierende Mittelwert betrug 0,237 nmol/60 min/100 Mio Zellen.

c) Am 10. Tag war der niedrigste Wert bei 3 Bestimmungen 0,015 nmol/60 min/100 Mio Zellen, der höchste Wert 0,185 nmol/60 min/100 Mio Zellen und der Mittelwert 0,100 nmol/60 min/100 Mio Zellen.

d) Die Werte der L-Asparaginsynthetase-Aktivität am 11. Tag lagen bei 7 Bestimmungen zwischen 1,090 nmol/60 min/100 Mio Zellen und 0,235 nmol/60 min/100 Mio Zellen; als Mittelwert resultierte 0,697 nmol/60 min/100 Mio Zellen

Wurde der Ausgangswert von 0,276 = 100% gesetzt, ergab sich für den Mittelwert der L-Asparagin-Synthetase-Aktivität am 9. Tag nach der Tumortransplantation ein Absinken um 14,13%. Am 10. Tag war die Aktivität gemessen an den Mittelwerten nochmals um 63,77% abgefallen. Am 11. Tag nach der Tumortransplantation stieg die Aktivität der L-Asparagin-Synthetase um 152,53% gegenüber dem am 8. Tag gewonnenen Mittelwert.

2. Die Bestimmung der Aktivität der L-Asparagin-Synthetase in Ascitestumorzellen von Groppel Mäusen nach Gabe von 200 E. L-Asparaginase. Am 8. Tag nach der Transplantation des Ehrlich Carcinoms in Ascitesform wurde den Tieren 200 E. Crasnitin intraperitoneal verabreicht und diese Injektion als zeitlicher Ausgangspunkt für die folgenden Probenentnahmen nach jeweils 24 Stunden festgelegt.

a) Die Werte der L-Asparagin-Synthetase zu Beginn der Untersuchungen am 8. Tag nach der Tumortransplantation entsprachen den Ergebnissen der für die unbehandelten Tiere gefundenen Aktivitäten; als mittlerer Wert hier 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen.

b) Die Bestimmung der L-Asparagin-Synthetase am 9. Tag nach der Tumortransplantation ergab von 14 Tieren den gleichen mittleren Wert wie bei unbehandelten Tieren am 8. Tag nach der Tumortransplantation, nämlich 0,275 nmol/60 min/100 Mio Zellen.

c) Die Werte der L-Asparagin-Synthetase am 10. Tag nach der Tumortransplantation und 48 Stunden nach Crasnitin Injektion zeigten nur eine geringe Abnahme. Der mittlere Wert der Aktivität lag hier bei 0,228 nmol/60 min/100 Mio Zellen von 13 verschiedenen Meßergebnissen.

d) Am 11. Tag nach der Tumortransplantation, 72 Stunden nach L-Asparaginase-Applikation stieg der mittlere Wert der L-Asparagin-Synthetase steil an auf 0,559 nmol/60 min/100 Mio Zellen, also um eine Differenz von 0,238 im Vergleich zum Zeitpunkt Null, oder um 0,231 im Vergleich zu dem Wert der mittleren Aktivität bei 48 Stunden.

Es zeigte sich, daß die Aktivität der zellulären L-Asparagin-Synthetase nach L-Asparaginase als einmaliger Injektion nach 24 stündiger Beobachtungszeit um 0,36%, nach 48 Stunden um 17,39% im Vergleich

zum Ausgangswert, der gleich 100% gesetzt wurde, nur gering abnahm. Nach 72 Stunden trat ein erheblicher Anstieg der Synthetase um 102,54% gegenüber dem Ausgangswert auf, bzw. um 145,17% im Vergleich zu dem nach 40 Stunden gewonnenen Ergebnis. Als Bezugspunkte dienten hierbei die bei den vier Messungen resultierenden Mittelwerte.

3. Die Aktivität der L-Asparagin-Synthetase in Ascitestumorzellen nach Gabe von 200 E. L-Asparaginase bezogen auf den Proteingehalt der Probe. Nach der im 2. Teil beschriebenen Methode wurden die Ergebnisse auf den Proteingehalt des homogenisierten und ultrazentrifugierten Ascitespunktes bezogen und die Werte miteinander verglichen.

- a) Die L-Asparagin-Synthetase am 8. Tag nach der Tumortransplantation: Mittelwert bei 12 Tieren  $0,0294 \text{ nmol/60 min/1 mg}$ .
- b) Die L-Asparagin-Synthetase am 9. Tag nach der Tumortransplantation: Die Aktivitäten 24 Stunden nach der Injektion verringerten sich damit um 19,8% gegenüber den Ausgangswerten. Mittelwert bei 15 Tieren  $0,0236 \text{ nmol/60 min/1 mg}$ .
- c) Die L-Asparagin-Synthetase am 10. Tag nach der Tumortransplantation, 48 Stunden nach L-Asparaginase-Injektion: Mittelwert bei 13 Tieren  $0,0193 \text{ nmol/60 min/1 mg}$ . Im Vergleich zu den Werten am 8. Tag nach der Tumortransplantation gingen die Aktivitäten 48 Stunden später um 34,4% zurück; gegenüber den Aktivitäten 24 Stunden post injectionem war hier eine Abnahme um 18,3% zu verzeichnen.
- d) Die L-Asparagin-Synthetase am 11. Tag nach der Tumortransplantation, 72 Stunden nach der Injektion von L-Asparaginase: Bei 12 Messungen ergab sich ein mittlerer Wert von  $0,0413 \text{ nmol/60 min/1 mg}$ . Damit eine Zunahme von 0,0124 oder 2,1% gegenüber den Ausgangswerten. Im Vergleich zu den Werten 40 Stunden nach

der Injektion von L-Asparaginase erhöhte sich die durchschnittliche Aktivität um 116,5%.

Im Gesamtvergleich ergab sich bei einem mittleren Ausgangswert von 0,282 nmol für die Aktivität der L-Asparagin-Synthetase 24 Stunden nach Injektion von L-Asparaginase 0,255 nmol, d.h. ein Abfall um 9,57%; nach 48 Stunden 0,234 nmol, oder eine Abnahme der Aktivität gegenüber dem Leerwert um 17,02%. Nach 72 stündiger Beobachtungszeit stieg die Aktivität im Mittel auf 0,488 nmol oder um 73,23% gegenüber der Ausgangsaktivität an.

#### IV Diskussion der Ergebnisse

Das Hauptproblem der L-Asparagin-Synthetase-Bestimmung besteht in der Trennung von Asparaginsäure und Asparagin. Bei der Inkubation vitaler Ascitestumorzellen mit radioaktiv markierter Asparaginsäure erfolgt eine Umwandlung von Asparaginsäure der Aktivität der zellulären Asparagin-Synthetase entsprechend in Asparagin. Mit der säulenchromatographischen Trennung von Asparaginsäure und Asparagin sind zwar nach den Angaben von BENSON (5) die Voraussetzungen dafür erfüllt. Wir stellten jedoch einige Fehlerquellen bei der Chromatographie fest in Form von Lufteinschlüssen im Austauscherharz, wenn Stickstoff beim Einpressen der Probe in die Säule gelangte, sowie Verbleiben von Lithiumhydroxid, das zum Waschen des Austauscherharzes nach einer Analyse verwendet wurde, oder ungenügende Druckverhältnisse während des Analysenganges, die zu falschen Resultaten führten. Methodische Probleme bereitete auch die Gewinnung von 1 ml Ascitesflüssigkeit, da sich die Ascitesbildung bei den Tieren sehr unterschiedlich zeigte. Häufig war zu Beginn der Testreihe am 8. Tag nach der Tumortransplantation kaum Ascitesflüssigkeit mittels der Spritze zu aspirieren, so daß die Versuchstiere bereits am 8. Tag getötet werden mußten, um präparatorisch i.p. Ascitesflüssigkeit für diesen Meßzeitwert erhalten zu können. Die so gewonnenen Werte lagen immer im Streubereich der Ergebnisse der Tiere, die in der Mehrzahl den Zyklus der vier Probenentnahmen normal durchliefen, so daß die präparatorische Ascitesgewinnung auf die Ergebnisse ohne Einfluß blieb.

Die Asparagin-Synthetase-Aktivität des Ehrlich Ascites Carcinoms bei Grobvel Mäusen, die zum Vergleich keiner Asparaginasebehandlung unterworfen wurden, zeigte nach 48 Stunden eine leicht abfallende

Tendenz: 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen als Ausgangswert im Mittel zum Zeitpunkt Null; nach 24 Stunden 0,237 nmol/60 min/100 Mio Zellen und nach 48 Stunden 0,100 nmol/60 min/100 Mio Zellen. Am 4. Tag oder nach 72 Stunden war die Synthetase-Aktivität sprunghaft gestiegen; sie lag um mehr als 0,5 nmol/60 min/100 Mio Zellen höher als 24 Stunden zuvor; das war im Vergleich mit dem Ausgangswert eine Zunahme um 116,3%. Einen leichten Rückgang der Aktivität der Asparagin-Synthetase zeigten auch die Ergebnisse der Mäuse, die eine Injektion von 200 E. L-Asparaginase i.p. bei dem mittleren Ausgangswert von 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen erhalten hatten. Nach 24 Stunden ebenfalls 0,276 nmol/60 min/100 Mio Zellen, nach 48 Stunden 0,228 nmol/60 min/100 Mio Zellen und nach 72 Stunden als Ausdruck des Anstieges der Aktivität ein mittlerer Wert von 0,559 nmol/60 min/100 Mio Zellen, im Vergleich mit dem Ausgangswert ein Anstieg von 102,5%.

Sinngemäß die Aktivität der Asparagin-Synthetase bei den auf den Proteingehalt der Proben bezogenen Werten: Als mittlerer Leerwert ergab sich 0,0294 nmol/60 min/1 mg, dann die leicht abfallende Tendenz bis zum 4. Tag nach der Tumortransplantation; nach 24 Stunden 0,0236 nmol/60 min/1 mg, nach 48 Stunden 0,0193 nmol/60 min/1 mg. Bei 72 Stunden ein Ansteigen auf 0,0418 nmol/60 min/1 mg. Es sind also am 11. Tag nach der Tumortransplantation oder 72 Stunden nach erfolgter Asparaginase Injektion im Vergleich zu den Ausgangswerten die Aktivitäten der Asparagin-Synthetase im Durchschnitt um 143% gestiegen.

Da die ersten drei Messwerte, 0,24 und 48 Stunden nach Asparaginase-applikation, relativ nahe beieinander liegen, 0,230 nmol/60 min/100 Mio Zellen, die 72 Stunden Werte jedoch als Mittelwert bei 0,558 nmol/60 min/100 Mio Zellen, was einem Anstieg um 143% ent-

spricht, ist zwischen der 48. und 72. Stunde nach Asparaginaseapplikation und auch besonders im Hinblick auf das gleiche Verhalten der Leerwerte zu schließen, daß die Aktivität der Asparagin-Synthetase nach dem 10. Tag nach der Tumortransplantation beträchtlich angestiegen ist und zwar offensichtlich unabhängig von der Asparaginasetherapie.

Aus klinischer Sicht wurde als Ursache der Asparaginase Resistenz die Bildung von Asparaginase-Antikörpern in Verbindung mit einer starken Immunglobulinvermehrung angegeben (31); jedoch kam es zu keiner auffälligen Verminderung der Immunglobulinkonzentration nach Absorption einzelner Patientenserum mit Asparaginase; die gegen Asparaginase gebildeten Antikörper können also nur einen geringen Teil an der Vermehrung ausmachen. Es bestand auch kein zeitlicher Zusammenhang mit einem positiven oder negativen Therapieerfolg (18).

Es muß also mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß primär gegenüber Asparaginaseentzug empfindliche Zellen sich entweder als Folge einer Zellselektion oder durch Induktion an die Asparaginmangelsituation durch ansteigende Synthetaseaktivität adaptieren und damit therapieresistent werden (14).

Nach einer früheren Mitteilung (18) und eigenen Analysen zeigten die Kontrollen von Mäuseascitestumorzellen im Verlauf von 72 Stunden ein spontanes Ansteigen der Aktivität der Asparagin-Synthetase, so daß im Gegensatz zu unserer theoretischen Vorstellung auch ohne Therapie mit Asparaginase im Sinne der Enzyminduktion mit einem spontanen Ansteigen der zellulären Asparagin-Synthetase-Aktivität und damit einer Resistenzentwicklung vorher L-Asparaginase empfindlicher Zellen zu rechnen ist.

## V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde berichtet über Untersuchungen der L-Asparagin-Synthetase nach Induktion mit L-Asparaginase, gemessen am Ehrlich Carcinom in Ascitesform bei Mäusen. Es zeigte sich, daß

1. die Aktivität der L-Asparagin-Synthetase in Tumorzellen bei Mäusen vom 3. bis zum 10. Tag nach erfolgter Tumortransplantation geringfügig abnimmt und am 11. Tag oder 72 Stunden nach Untersuchungsbeginn spontan um mehr als das Doppelte an Aktivität zunimmt,
2. die Aktivität der L-Asparagin-Synthetase in den Zellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms nach Behandlung mit L-Asparaginase in Form einer einmaligen Injektion von 200 E. i.p. nach erfolgter Tumortransplantation bis zum 10. Tag (48 Stunden nach Behandlungsbeginn) leicht abnimmt, um am 11. Tag dann auf den doppelt so hohen Wert zu steigen,
3. sich die proteinbezogenen Werte der L-Asparagin-Synthetase ebenso verhalten.

Der angenommene Anstieg der zellulären L-Asparagin-Synthetase-Aktivität unter L-Asparaginase Einwirkung als Ausdruck einer hypotetischen Enzyminduktion entspricht der spontanen Aktivitätssteigerung der L-Asparagin-Synthetase auch ohne L-Asparaginase Therapie im Ablauf der malignen Erkrankung. Eine Enzyminduktion durch L-Asparaginase im Sinne der Resistenzentwicklung kann deshalb in unserer Versuchsanordnung ausgeschlossen werden.

VI. Tabellen

Ergebnisse

Tabelle A

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen bei un-  
behandelten Tieren.

Werte zur Zeit 0

0,087 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,106

0,378

0,405

0,158

0,187

0,090

0,202

0,324

0,517

0,390

0,470

Mittelwert

0,276

Ergebnisse

Tabelle B

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen bei un-  
behandelten Tieren.

Werte zur Zeit 24 h

0,276 nmol/60 min/100 mio Zellen

0,199

Mittelwert

0,237

Ergebnisse

Tabelle C

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen bei un-  
behandelten Tieren.

Werte zur Zeit 48 h

0,185 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,015

0,096

Mittelwert

0,100

Ergebnisse

Tabelle D

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen bei un-  
behandelten Tieren.

Werte zur Zeit 72 h

0,235 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,546

0,752

1,090

0,850

0,575

0,832

Mittelwert

0,697

Ergebnisse

Tabelle E

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen nach Gabe  
von 200 E L-Asparaginase pro Maus zum Zeitpunkt 0

Werte 24 h

0,084 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,090

0,111

0,330

0,648

0,380

0,359

0,450

0,117

0,239

0,280

0,085

0,348

0,340

Mittelwert

0,175

## Ergebnisse

### Tabelle F

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen nach Gabe von 200 E L-Asparaginase pro Maus zu Zeitpunkt 0.

Werte 48 h

0,090 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,076

0,220

0,408

0,189

0,370

0,060

0,569

0,174

0,138

0,130

0,253

0,289

Mittelwert

0,228

# Ergebnisse

## Tabelle G

Werte der Asparaginsynthetaseaktivität in Asciteszellen nach Gabe von 200 E L-Asparaginase pro Maus zum Zeitpunkt 0.

Werte 72 h

0,038 nmol/60 min/100 Mio Zellen

0,250

0,193

0,747

0,503

0,612

0,559

0,722

1,410

Mittelwert

0,559

## Ergebnisse

### Tabelle H

Werte der Asparaginsynthetase - Aktivität in Asciteszellen nach  
Gabe von 200 E L - Asparaginase pro Maus;bezogen auf den Protein-  
gehalt

#### Leerwerte

0,0137 nmol/60 min/ 1 mg

0,0145

0,0429

0,0033

0,0296

0,0192

0,0170

0,0325

0,0166

0,0590

0,0478

0,0570

#### Mittelwert

---

0,0294

Ergebnisse

Tabelle I

Werte der Asparaginsynthetase - Aktivität in Asciteszellen nach  
Gabe von 200 E I - Asparaginase pro Maus;bezogen auf den Protein-  
gehalt

Werte 24 h

0,0137 nmol/60 min/ 1 mg

0,0139

0,0209

0,0292

0,0317

0,0141

0,0253

0,0120

0,0165

0,0258

0,0215

0,0085

0,0199

0,0409

0,0583

Mittelwert

---

0,0236

Ergebnisse

Tabelle K

Werte der Asparaginsynthetase - Aktivität in Asciteszellen nach  
Gabe von 200 E L - Asparaginase pro Maus;bezogen auf den Protein-  
gehalt

Werte 43 h

0,0166 nmol/60 min/ 1 mg

0,0175

0,0154

0,0353

0,0115

0,0383

0,0042

0,0278

0,0160

0,0076

0,0152

0,0152

0,0119

Mittelwert

---

0,0193

Ergebnisse

Tabelle L

Werte der Asparatinsynthetase - Aktivität in Asciteszellen nach  
Gabe von 200  $\mu$  L - Asparaginase pro Maus;bezogen auf den Protein-  
gehalt

Werte 72 h

0,0057 nmol/60 min/ 1 mg

0,0231

0,0191

0,0191

0,0751

0,0470

0,0458

0,0438

0,0636

0,0713

0,0393

0,0317

Mittelwert

---

0,0418

VII Abbildungen

Abbildung I

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen von  
unbehandelten Groppel Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit seit  
der Tumortransplantation

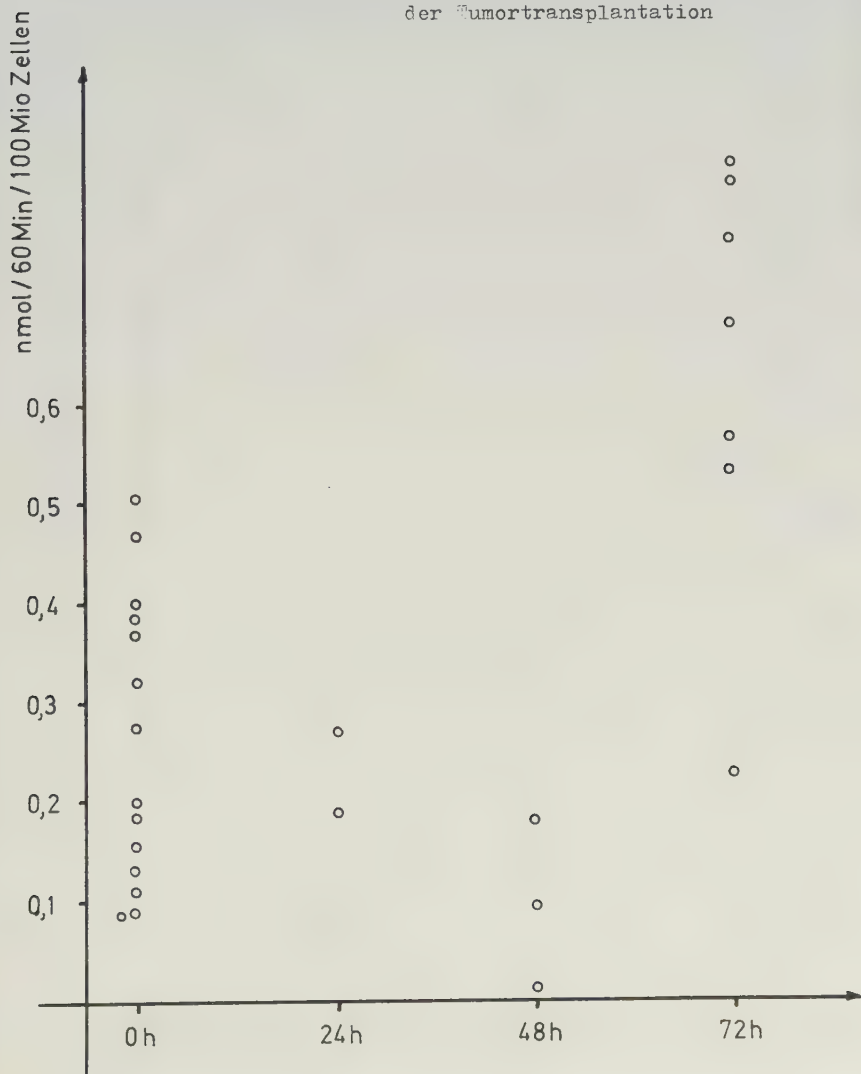


Abbildung II

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen von unbehandelten Groppe! Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit seit der Tumortransplantation

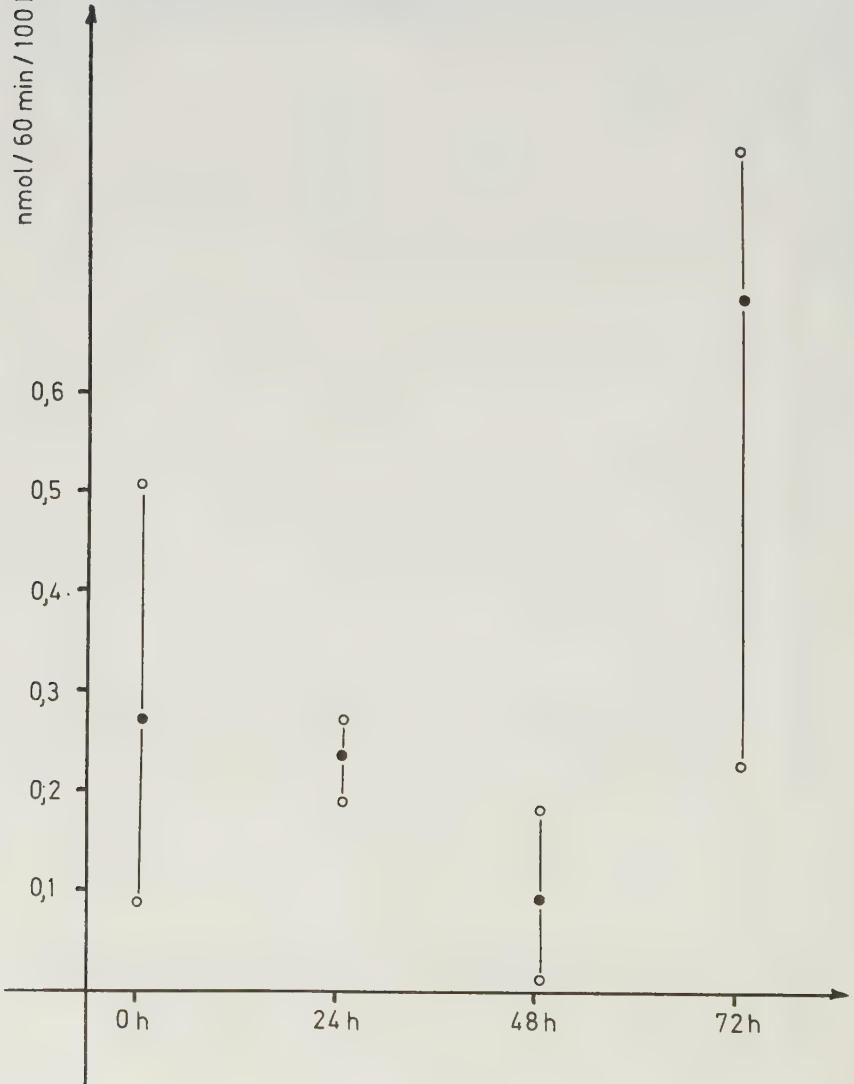


Abbildung III

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen von Groppe Mäusen nach Gabe von 200 E L-Asparaginase aus *Escherichia coli* in Abhängigkeit von der Zeit

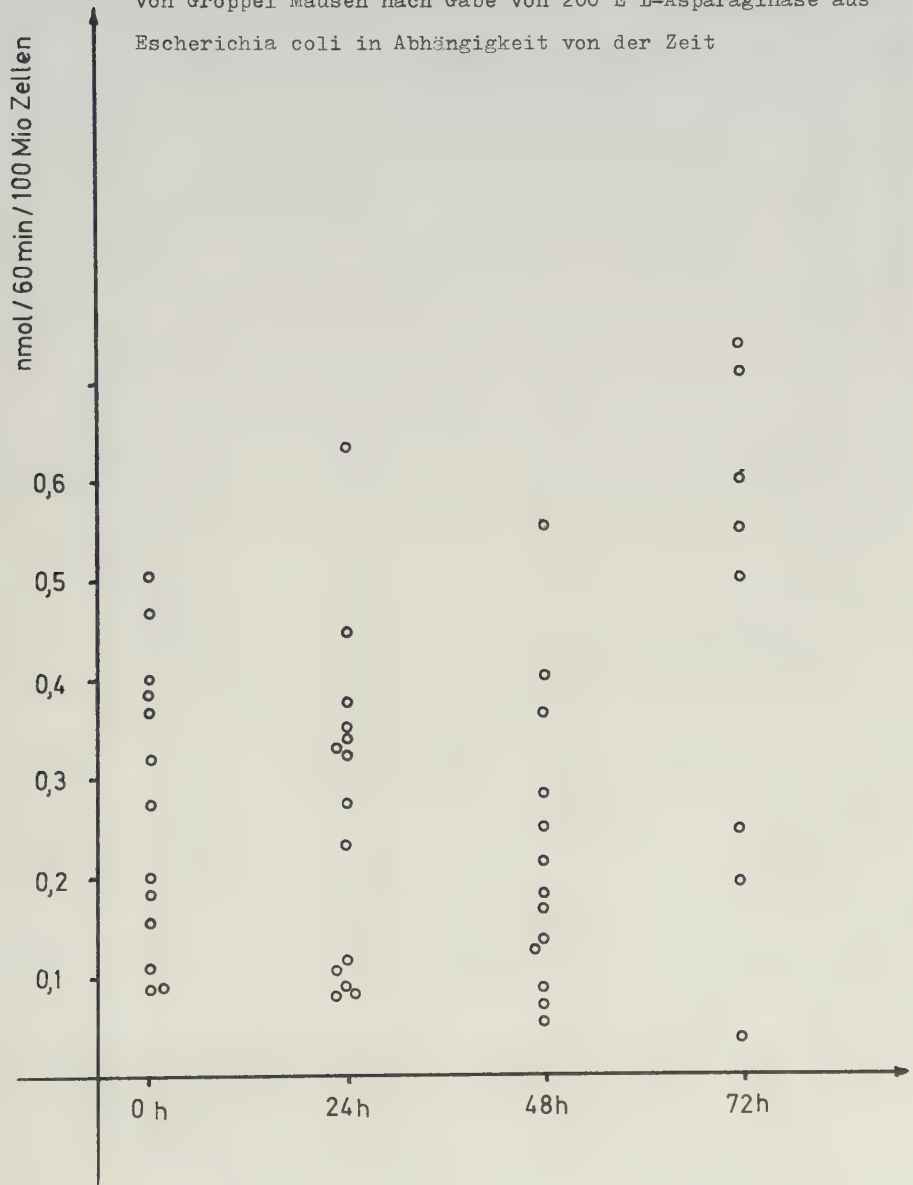


Abbildung IV

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen von Groppe Mäusen nach Gabe von 200 E L-Asparaginase aus *Escherichia coli* in Abhängigkeit von der Zeit

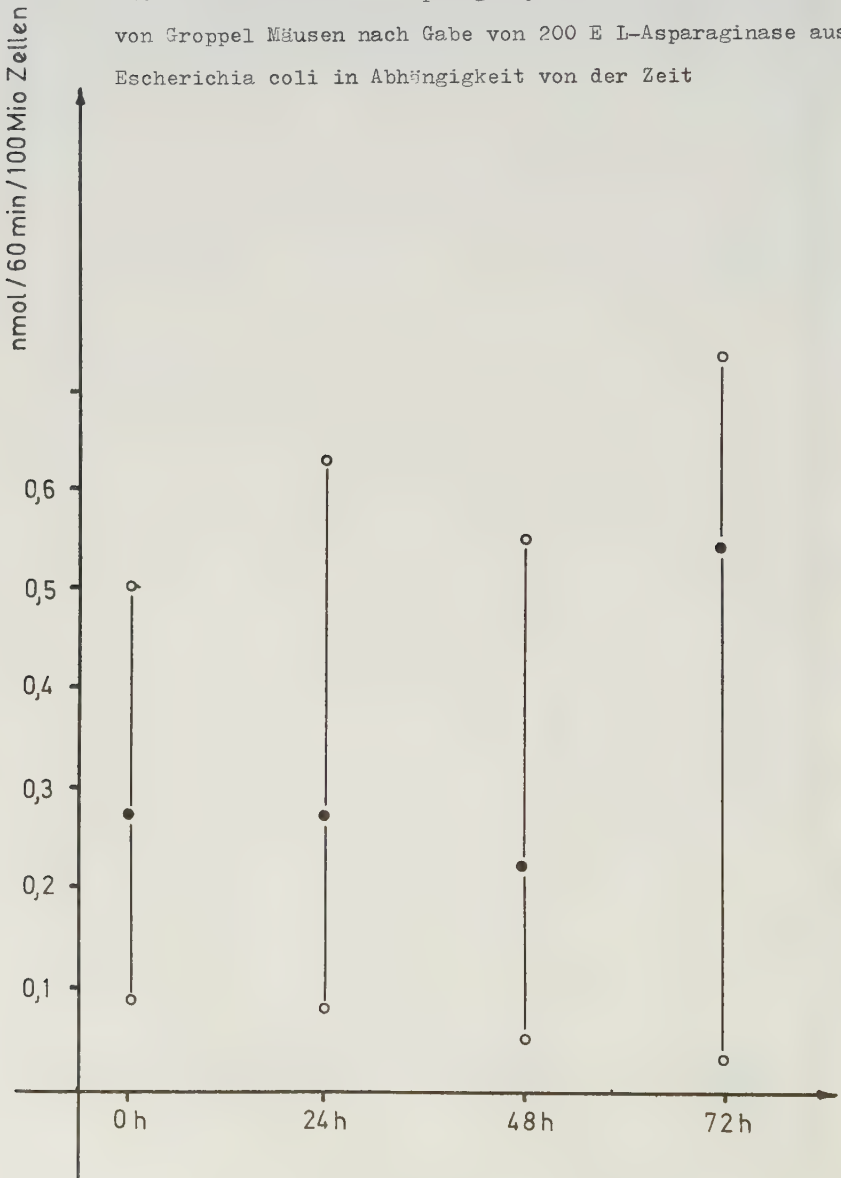


Abbildung V

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen nach  
Gabe von 200 E. L - Asparaginase pro Maus in Abhängigkeit von  
der Zeit und bezogen auf den Proteingehalt der Probe

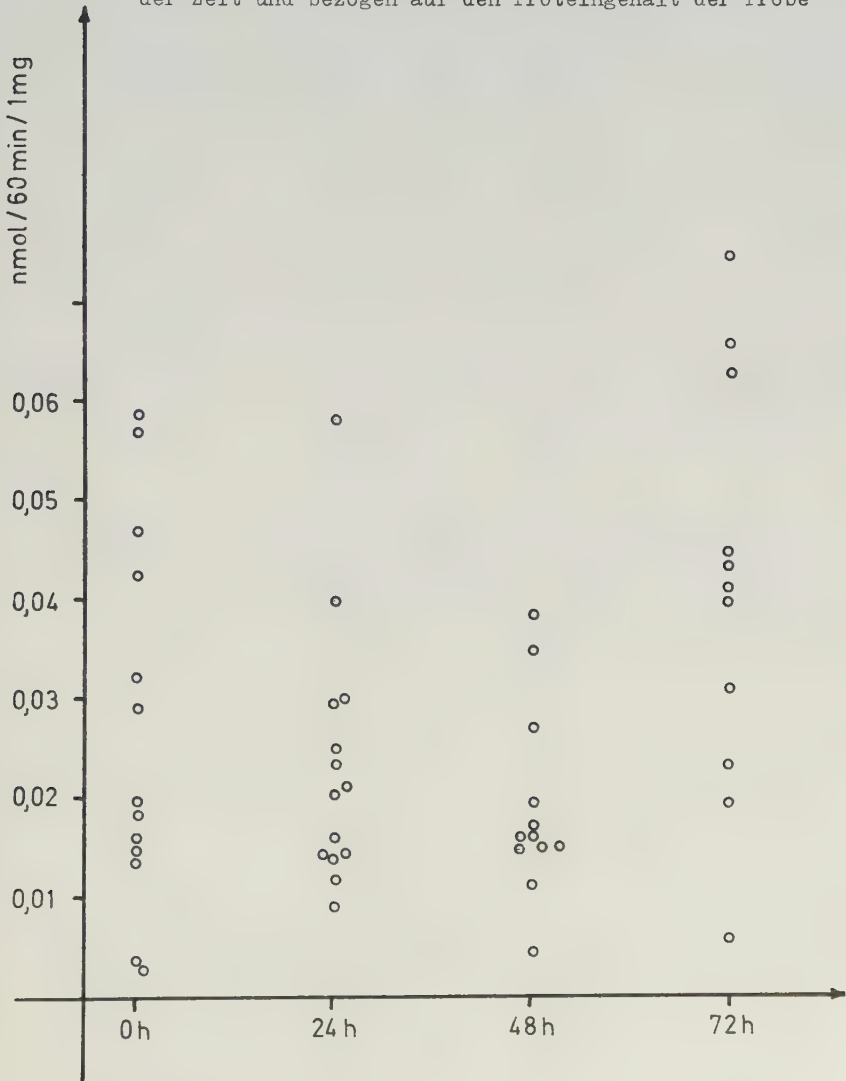
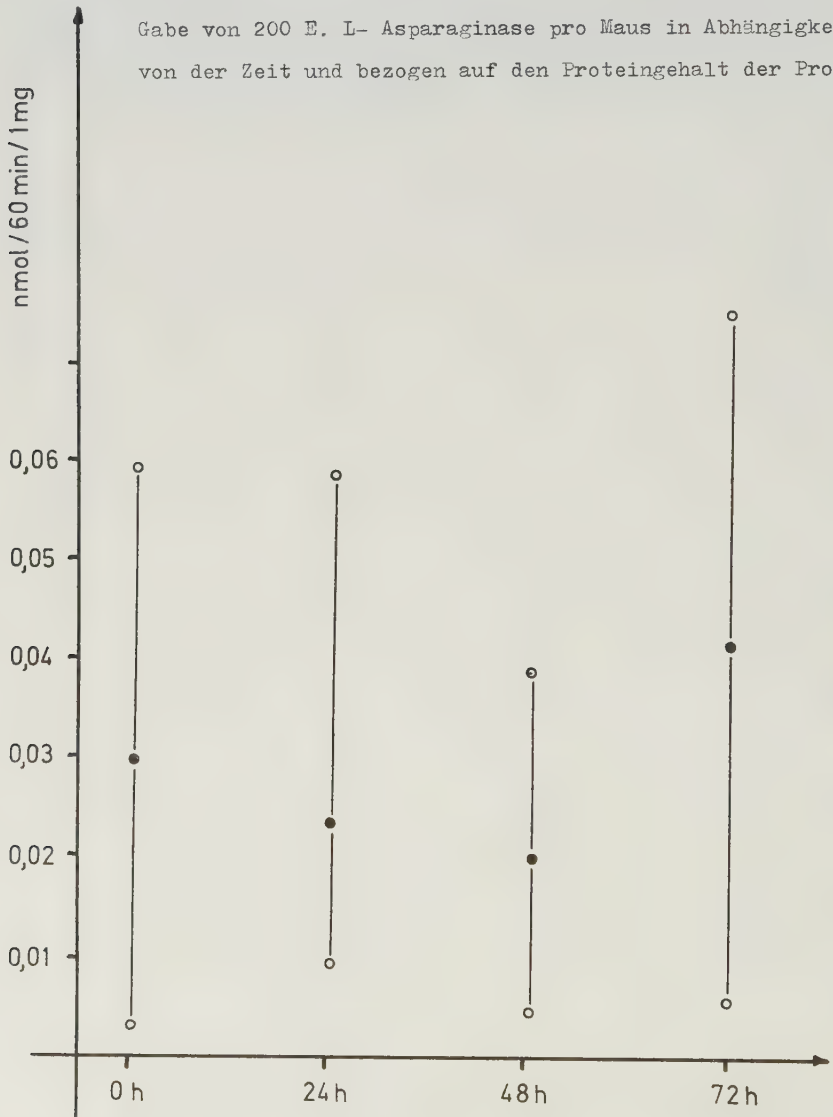


Abbildung VI

Die Aktivität der L - Asparaginsynthetase in Asciteszellen nach Gabe von 200 E. L- Asparaginase pro Maus in Abhängigkeit von der Zeit und bezogen auf den Proteingehalt der Probe



VIII. Schrifttum

1. ADAMSON, R.H., FABRO, S.: Some studies with asparaginase, asparagine and asparagina analogs  
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 8, 2 (1968)
2. ADAMSON, R.H., FABRO, S.: Embryotoxic effects of L - asparaginase  
Nature 218, 1164 - 1165 (1968)
3. BAUER, K.: Zur Biochemie der Asparaginase  
Med. Klinik 1, 9 - 12 (1969)
4. BEGEMANN, H., HARWERTH, H.G.: Praktische Hämatologie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1971
5. BENSON, J.V., GORDON, M.J., PATTERSON, J.A.: Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing Glutamine and Asparagine  
Anal. Biochem. , 228 - 240 (1966)
6. BORELLA, L., JOURNEY, C.H., HIRAMOTO, R.: In vivo and in vitro effects of the L - asparaginase fraction of guinea pig serum on the 6C3HED ascites lymphosarcoma  
Cancer Res. 26, 2451 (1966)
7. BOYSE, E.A., OLD, L.J., CAMPBELL, H.A., MASHBURN, L.T.: Suppression of murine leukemias by L - asparaginase  
J. exp. Med. 125, 17 - 31 (1967)
8. BROOME, J.D.: Evidence that the L - asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects  
Nature 191, 1114 (1961)

9. BROOME, J.D.: Evidence that the L- asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects  
J.exp.Med. 118, 99 -121 (1963)
10. BROOME, J.D.: A method for estimating free asparagine and glutamine in biological fluids as trinitro-phenyl derivates  
Nature 211, 602 - 604 (1966)
11. BROOME, J.D. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L - asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilisation in aspa-  
raginase sensitive and -resistant lymphoma cells  
J.exp.Med 127, 1055 - 1072 (1968)
12. BURCHENAL, J.H., LASH, E., SCHWARTZ, M., DOLLINGER, M.: Effects and concentration of L - asparaginase in intra-cerebrally inoculated leukemia  
Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 8, 10 (1968)
13. CAMPBELL, H.A., MASHBURN, L.T., BOYSE, E.A., OLD, J.D.: Two L - asparaginases from Escherichia coli B. Their separation, purification and antitumor activity  
Biochem. 6, 721 (1967)
14. CANELLOS, G.P., HASKELL, Ch.M.: Studies of resistance to L - asparaginase in human leukemia  
Experimental and clinical effects of L -

asparaginase

Ed. GRUNDMANN, E., OETTGEN, H. F.

Springer Verlag 188 - 192 (1970)

15. CLEMENTI, A.: La desamination enzymatique de l'asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme  
Arch.int.Physiol. 19 ,369 (1922)
16. DOLOWY, W.C., ELROD, L.M., AMMERAAL, R.N., SCHREK, R.: Toxicity of L-asparaginase to resistant and susceptible lymphoma cells in vitro  
Proc.Soc.f.Exp.Biol.and Med. 125,598-601(1967)
17. DOLOWY, W.C., SCHREK, R., HENSON, D., CORNET, J., BROWN, E.: Effects of guinea pig serum on the Walker 236 carcinoma  
Nature 218,1028-1031 (1968)
18. EHRHART, H.: Therapie mit Asparaginase  
Vortrag Physiol.Biochem.München 1.2.1971
19. EHRHART, H.: Internistische Tumorthherapie  
pro medico 5,93-96(1974)
20. FATEH - MOGHADAM, A.,  
quantitative Veränderungen der Serumproteine und - lipide im Verlauf der Asparaginase - Therapie maligner Tumoren und Hämoblastosen  
Klin.Wschr.2,116-125(1970)
21. GALLMEIER, W.M., SCHWEDT, C.G.: Enzymtherapie - ein neues Prinzip in der Behandlung maligner Tumoren und Hämoblastosen  
Dtsch.med.Wschr.93,814-820(1968)

22. GRUNDMANN, E.: L - Asparaginase und Leukämie  
Klin.Wschr. 2, 61-64 (1969)
23. HABEEB, A.F.S.A.: Determination of free amino groups in Proteins by trinitrobenzenesulfonic acid  
Analyt.Biochem. 14, 328-336 (1966)
24. HYNES, R., OSUGA, D.T., FEENEY, R.E.: Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes  
Analyt.Biochem. 2, 541-547 (1967)
25. HOLZENBERG, J.S., PEASE, J.: Asparagine synthesis in guinea pig liver  
Biochem.Biophys.Acta 158, 500-502 (1968)
26. HOROWITZ, B., MADRAS, B.K., MEISTER, A., OLD, L.J., BOYSE, E.A., STOCKERT, E.:  
Asparagine synthetase Activity of mouse leukemias  
Science 160, 533-535 (1968)
27. KIDD, J.G.: Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum  
J.exp.Med. 98, 565-583 (1953)
28. KIDD, J.G., SOBIN, L.H.: The incorporation of L - asparagine -  $^{14}\text{C}$  by lymphoma 6 C3HED - cells. Its inhibition by guinea pig serum  
Cancer Res. 26, 208 (1966)
29. KIRCHNER, H., BAUER, S.: Wirkung von L - Asparaginase aus E.coli auf Phytohämagglutinin stimulierte Lymphocytenkulturen  
Klin.Wschr. 1, 50-51 (1970)
30. KRONBERGER, L., FINK, E.: Asparagin und Asparaginsäure im Vollblut bei malignen und benignen Erkrankungen  
Med.Klin. 46, 2148-2150 (1969)

31. LAMERZ, R., FATEH-MOGHADAM, A., HORNING, B., EHRHART, H.: Immun-  
globulinvermehrung und Antikörperbildung  
unter Asparaginasetherapie  
Klin. Wschr. 6, 360-364 (1971)
32. MAROUARDT, H.: L-Asparaginase - das erste spezifische Cyto-  
staticum  
Arzneimittel-Forsch. 18, 1380-1383 (1968)
33. MASHBURN, L.T., WRISTON, J.C.: Tumor inhibitory effect of L -  
asparaginase from E.coli  
Arch. Biochem. 105, 450-452 (1964)
34. I. NYMPHENBURGER HÄMATOLOGISCHES GESPRÄCH, München 23.1.1969  
Asparaginase und Asparaginasetherapie  
Klin. Wschr. 9, 498-499 (1969)
35. OETTGEN, H.F., OLD, L.J., BOYSE, E.A., CAMPBELL, H.A., PHILIPS, F.S.:  
Inhibition of leukemias in man by L - aspara-  
ginase  
Cancer Res. 27, 2619-2631 (1967)
36. OETTGEN, H.F., et al.: Inhibition of leukemias in man by L -  
asparaginase  
Blood. 30, 552 (1967)
37. OETTGEN, H.F., SCHULTEN, H.K.: Hemmung maligner Neoplasien des  
Menschen durch L - Asparaginase  
klin. Wschr. 2, 65-70 (1969)
38. OETTGEN, H.F.: L - Asparaginase: Ein neues Prinzip in der  
Chemotherapie maligner Neoplasien  
Blut 19, 351-355 (1969)
39. OLD, L.J., BOYSE, E.A., CAMPBELL, H.A.: L - asparagine and leu-  
kemia  
Sci. American 219, 34-40 (1968)

40. PATTERSON, M.K., ORR, G.R., MCCOY, T.A.: Asparagine  $^{14}$  C and glutamine  $^{14}$  C from animal cell protein and their chemical degradation  
Anal. Biochem. 6, 543-548 (1963)
41. PATTERSON, M.K., ORR, G.R.: Regeneration, tumor, dietary, and L - asparaginase effects on asparagine biosynthesis in rat liver  
Cancer Res. 29, 1179-1183 (1969)
42. PRAGER, M.D., BACHYNSKY, N.: Asparagine synthetase in normal and malignant tissues; correlation with tumor sensitivity to asparaginase  
Arch. of Biochem. and Biophysics 127, 645-654 (1968)
43. SCHREK, R., DOLOWY, W.C., AMMERAAL, R.N.: L - asparaginase: toxicity to normal and leukemic human lymphocytes  
Science 155, 329-330 (1967)
44. STIER, H.W., GALLMEIER, W.M., SCHMIDT, C.G.: Über Störungen des Blutgerinnungssystems im Verlaufe der Enzymtherapie maligner Tumoren und Hämoblastosen  
Dtsch. med. Wschr. 6, 253-260 (1969)
45. WILMANN, W.: Akute Leukämien  
in: Therapie Innerer Krankheiten  
Springer Verlag 1973

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof.Dr.H.Ehrhart für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen im Verlaufe der Arbeit;

bei Frau E.Hiftlein bedanke ich mich für die große Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeit,sowie bei Herrn Dr.R.Hartenstein für seine Unterstützung.

## Lebenslauf

Geboren am 21.05.1946 zu Nürnberg als Sohn des Universitätsprofessors Dr.med.Werner Lang.

Seit 1948 wohnhaft in München.1952 bis 1956 Besuch der Volksschule in München,danach Besuch des humanistischen Wilhelms-gymnasiums in München;Abitur am 15.07.1967.

Nach zwei Semestern Veterinärmedizin,Zulassung zum Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig Maximilian Universität zu München zum Sommersemester 1969.Staatsexamen am 24.07.1973 mit dem Gesamtergebnis "gut".Erlangung der Approbation am 05.09.1974.

Oktober 1973 bis Juni 1974 als Assistent der Zahnstation des Krankenhauses Schwabing.

Seit Juli 1974 Ableistung eines 15 monatigen Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr.







